

## ミドリゾウリムシの共生クロレラをシクロヘキシミドで処理した時に誘導される変化の透過型電子顕微鏡観察

児玉 有紀<sup>1,2</sup>, 井上 勲<sup>1</sup>, 藤島 政博<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>筑波大・院生命環境科学, <sup>2</sup>学振PD, <sup>3</sup>山口大・院理工・環境共生系)

### Transmission electron microscopic observations of the symbiotic algae in *Paramecium bursaria* treated with cycloheximide

Yuuki KODAMA<sup>1,2</sup>, Isao INOUE<sup>1</sup> and Masahiro FUJISHIMA<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Life and Env. Sci., Tsukuba Univ., <sup>2</sup>Res. Fellow of JSPS PD, <sup>3</sup>Dept. Env. Sci. and Engineering, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ.)

#### SUMMARY

*Paramecium bursaria* cells harbor several hundred symbiotic algae in their cytoplasm. Each alga is enclosed in a perialgal vacuole derived from the host digestive vacuole, and the alga is thereby protected from digestion by lysosomal fusion. In a previous study, we reported that treatment of algae-bearing *Paramecium* cells with the protein synthesis inhibitor, cycloheximide, induces synchronous swelling of all perialgal vacuoles that are localized immediately beneath the host's cell surface. Subsequently, the vacuoles detached from beneath the host's cell surface, and the algae in the vacuoles were digested after host lysosomal fusion with the perialgal vacuole membrane. These phenomena are induced only under fluorescent light, and not under constant darkness. By transmission electron microscopy, it was revealed that the inner structure of symbiotic algae inside the perialgal vacuole membrane was destroyed immediately after treatment with cycloheximide. This change was observed before the swelling of the perialgal vacuole membrane. These results indicate that treatment with cycloheximide induces algal death even if the alga is enclosed within the perialgal vacuole membrane.

**【目的】** ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、*Paramecium*属の中では唯一クロレラを細胞内共生させる能力を持っている。ミドリゾウリムシの細胞質内には約700個のクロレラが共生している。各クロレラを包むperialgal vacuole (PV) 膜には宿主のリソソームが融合しないため、クロレラは宿主によって消化されることはない。PV膜がリソソーム融合を阻止する仕組みについてはこれまで全く明らかになっていない。我々は、ミドリゾウリムシをタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドで処理すると、24時間以内に細胞内の全てのPV膜が同調して膨潤し、その後PV膜にリソソームが融合して、共生クロレラの消化が誘導されることを明らかにした<sup>1)</sup>。さらに、この現象は恒明条件下 (LL) のみで起こり、恒暗条件下 (DD) や、光合成阻害剤のDCMU存在下では起きないことが分かった<sup>1)</sup>。PV膜やクロレラに起きる変化を詳細に観察するため、シクロヘキシミドによって誘導される一連の現象を透過型顕微鏡を用いて観察した。

#### 【材料と方法】

##### シクロヘキシミド処理

ミドリゾウリムシのシクロヘキシミド処理は Kodama and Fujishima<sup>1)</sup>に従って行った。5,000 cells/mlに調整した*P. bursaria* (OS1g1N株) にシクロヘキシミド

(Wako) を最終濃度が10 µg/mlになるように加え、その後25 ± 1°C, LLまたはDDでインキュベートした。

##### 透過型電子顕微鏡観察 (TEM)

TEM用のサンプルはOta et al.<sup>2)</sup>に基づいて作成した。シクロヘキシミド処理前と、処理してから18, 24, 48時間後にミドリゾウリムシを0.2 Mの蔗糖を含む2%グルタルアルデヒドで1時間前固定した。その後、1%のオスミウム酸で後固定を行い、さらに2%酢酸ウランで15分間ブロック染色を行った。エタノールシリーズによる脱水後、Spurr樹脂に包埋した。超薄切片を作製しReynolds液で染色した後、透過型電子顕微鏡で観察を行った。

##### クロレラの細胞分裂に与えるシクロヘキシミド処理の影響

上記の方法でミドリゾウリムシをシクロヘキシミドで処理し、24時間後にミドリゾウリムシからクロレラを単離した<sup>3)</sup>。その際、十分に洗浄を行い、シクロヘキシミドを除去した。血球計算盤で細胞数をカウントして5 × 10<sup>7</sup> cells/mlに調整した後、CA培地<sup>4)</sup>中で、クロレラを25 ± 1°C, LLでインキュベートし、シクロヘキシミド処理がクロレラの細胞分裂に与える影響を調べた。

**【結果】**透過型電子顕微鏡観察

シクロヘキシミドで処理する前のPV膜はクロレラの細胞壁と密着しているため、光学顕微鏡下では観察できない。TEMでも同様に、PV膜は細胞壁に密着していた。この時の共生クロレラの内部構造は明瞭であった。シクロヘキシミドで処理してから18時間後、一部のクロレラのPV膜の膨潤が光学顕微鏡下で観察された。TEMではリソソームがPV膜に接近する像が多数観察された。まだ膨潤が起きていないPV膜内のクロレラの中には、内部構造が乱れているものもあった。シクロヘキシミドで処理してから24時間後、光学顕微鏡下では観察したほぼ全てのPV膜が膨潤し、消化されたクロレラも多数観察された。TEMでも同様に、PV膜が大きく膨潤し、クロレラの内部構造が大きく乱れている像が多数観察された。シクロヘキシミドで処理してから48時間後、PV膜が再び収縮し光学顕微鏡下では観察不能になった。TEMでも同様にPV膜が再び収縮し、細胞壁に密着していた。クロレラの内部構造は乱れており、細胞壁も変形していた。

一方、DDで処理したサンプルにおいては、未処理のサンプルと比較してシクロヘキシミドで処理したサンプルには大きな変化は見られなかった。

クロレラの細胞分裂に与えるシクロヘキシミド処理の影響

ミドリゾウリムシ内で24時間シクロヘキシミド処理したクロレラは、内部構造が乱れていたことから示唆されるように既に細胞分裂能を失っていた。

一方、DDで処理したサンプルにおいては、クロレラは分裂能を失っていなかった。

**【考察】**シクロヘキシミドで処理してから24時間後には、細胞内の約7/8の共生クロレラが消化される<sup>1)</sup>。残りの1/7のクロレラは緑色をしており、その後、宿主によって消化されることは無いことから、クロレラは生きてしていると予測していた。しかし、TEMの結果から、シクロヘキシミドで処理した直後、PV膜の膨潤が誘導される以前にクロレラの内部構造はすでに壊れ、クロレラはシクロヘキシミドを完全に除去した後でも分裂出来ないことから死んでいることが分かった。これらの結果は、PV膜の形態は、PV膜内のクロレラが死んでいる状態でも維持されることを示している。この時のPV膜が本来のPV膜の性質と同等であるかは明らかではない。DD条件下では一連の変化が誘導されない理由についても未だ明らかではない。今後はLLとDD条件下でのシクロヘキシミドの影響の違いの理由や、シクロヘキシミド処理によってPV膜がリソソーム融合阻止能力を失う理由を明らかにしたい。

**【文献】**

- 1) Kodama and Fujishima (2008). *Protist* 159:483-494.
- 2) Ota et al. (2007). *J. Phycol.* 43:333-343.
- 3) Kodama and Fujishima (2005). *Protoplasma* 225:191-203.
- 4) Ichimura (1973). D Sci thesis, University of Tokyo, Tokyo, Japan